TOYOBO

2009 NOVEMBER
VOL. 94

UPLOAD

KOD -Plus- Neo
→本誌p.1に詳細記事がございます。

Brand-New item

1 高正確・高効率・高速PCR酵素
KOD -Plus- Neo キャンペーン

HOT ITEM

4 ホットスタート法対応・色素入りTaq Master Mix
Quick Taq® HS DyeMix

5 高効率リアルタイムPCR用マスターミックス
THUNDERBIRD™ (サンダーバード) qPCR Mix

千種万様 USER'S NOTE

7 製品KOD FXを用いた実施例
ホルマリン固定パラフィン包埋切片から抽出した
DNAの解析

TECHNICAL REVIEW

9 高成功率PCR酵素『KOD FX』を用いた
糸状菌からのコロニーPCR

HOT ITEM

11 Cell Applications, INC. 製品

FLASH NEWS

12 •ヒト / ラット アストロサイト •Transfected Lysate

INFORMATION

13 学会出展のご案内
13 大包装品発売および価格改定のご案内
13 初代細胞ロット情報配信のご案内

みんなの広場

14 実験川柳特集10

PCRは東洋紡

TOYOBO BIOCHEMICALS

Brand-New item

高正確・高効率・高速PCR酵素

KOD -Plus- Neo

発売記念キャンペーン 40%off

NEW

■期間：2009年11月2日～2010年3月19日（ご注文分）

サイクル後半での増幅の鈍化を改善。伸長時間短縮(30sec./kb)で理想的なクローニング用PCRを実現。

KOD DNA polymeraseは、強い3'→5'エキソヌクレアーゼ活性（校正活性）を有し、正確にターゲット配列を増幅することができるため、クローニング用のPCR酵素として好評いただいております。しかし、高正確性PCR酵素は、20～30サイクル以降、増幅が持続しなくなる〈プラトー現象〉が出やすいと言われています。KOD -Plus-Neoは、高正確性PCR酵素: KOD -Plus-シリーズの技術に、弊社で新たに開発した「伸長エンハンサー」を応用することでTaqの約80倍というKOD -Plus-シリーズの高い正確性を保持しつつ、〈プラトー現象〉を抑えることにより、微量な鋳型DNAからの増幅や長いターゲットの増幅効率を格段に向上させることに成功しました。

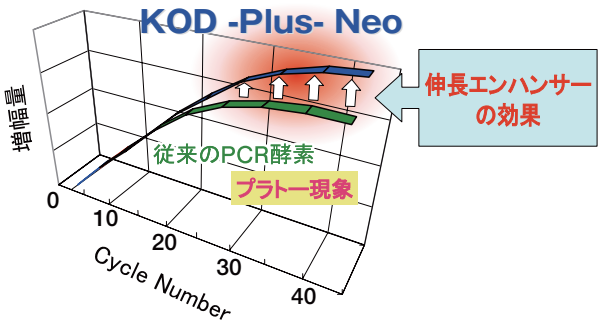


図1．伸長エンハンサーの効果

特長1 微量な鋳型DNAから正確・高効率な増幅が可能

伸長エンハンサー技術を応用することによって、微量な鋳型DNAからでも高正確・高効率に目的遺伝子を増幅することができるようになりました。本酵素は高い正確性（Taqの約80倍）を示し、低コピー数の鋳型からも正確に目的遺伝子を増幅することができます。

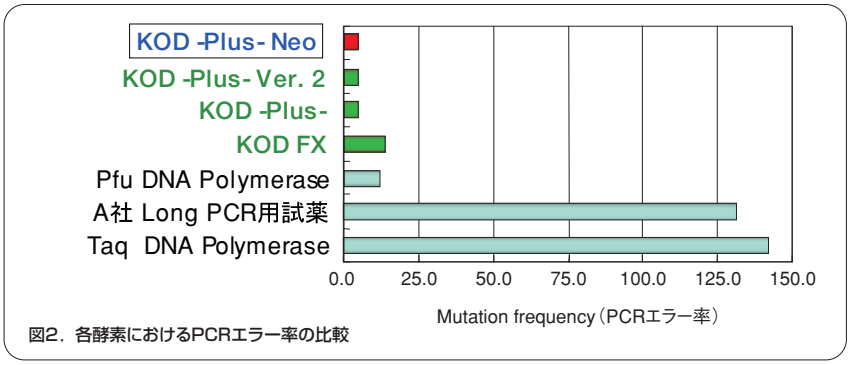
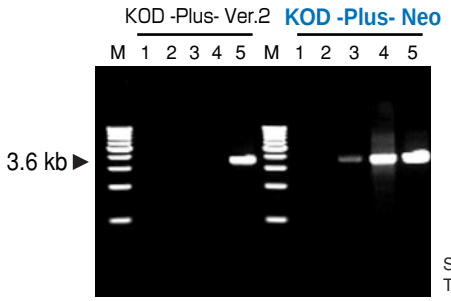


図2．各酵素におけるPCRエラー率の比較

特長2 伸長時間を短縮〈30sec./kb〉（長いターゲットでより便利になりました）

伸長時間を、従来品の60sec./kbから30sec./kbに短縮。長いターゲットでより便利になりました。



Sample:Genomic DNA（50ng）
Target:Human β-globin（3.6kb）

【サイクル条件】
94℃, 2min.
98℃, 10sec. ◀
68℃, X ┘ 30 cycles

伸長時間X：
1: 18sec.（5sec./kb）
2: 36sec.（10sec./kb）
3: 54sec.（15sec./kb）
4: 108sec.（30sec./kb）
5: 216sec.（60sec./kb）
M: 1kb DNA Ladder

図3．様々な伸長時間における増幅効率の比較

特長3 幅広いターゲットの増幅

従来品より伸長性が向上し、様々な長さのターゲットを増幅できます。ゲノムDNAで24kbまでの増幅を確認しています。

特長4　様々なプライマーで同一温度サイクル条件を実現

検討不要のサイクル条件を実現しました。20mer以上のプライマー（Tm値＞63℃）*においては、まずは2ステップサイクルをお試しください。検討要らずで簡単です。

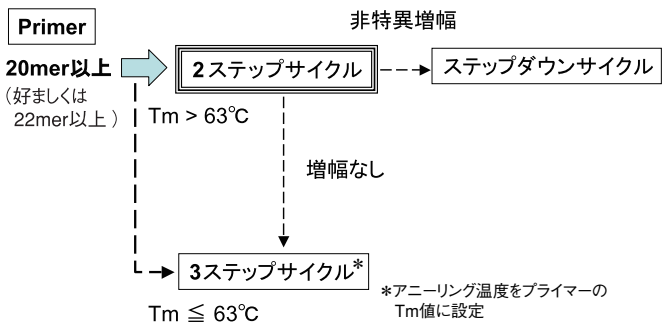
*Tm値は最近接塩基対法（Nearest Neighbor method）を用いて計算した値を利用しています。

一口メモ①　反応条件について

〈基本反応組成〉

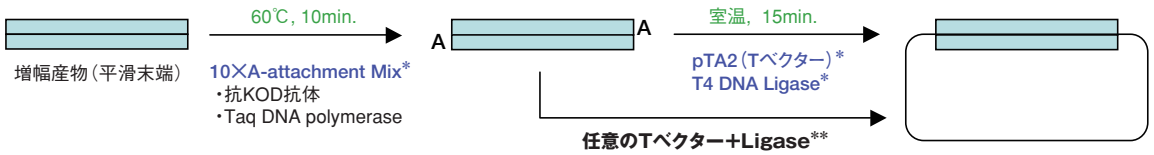
滅菌蒸留水	X μl
10×PCR buffer for KOD -Plus- Neo	5 μl
2mM dNTPs	5 μl
25 mM $MgSO_4$	3 μl
10pmol / μl Primer F	1.5 μl
10pmol / μl Primer R	1.5 μl
KOD -Plus- Neo （1.0U/ μl）	1 μl
Genomic DNA	～200ng
Plasmid DNA	～50ng
cDNA	～200ng（RNA相当）
Total	50 μl

〈サイクル選定条件〉



一口メモ②　PCR産物のクローニングについて

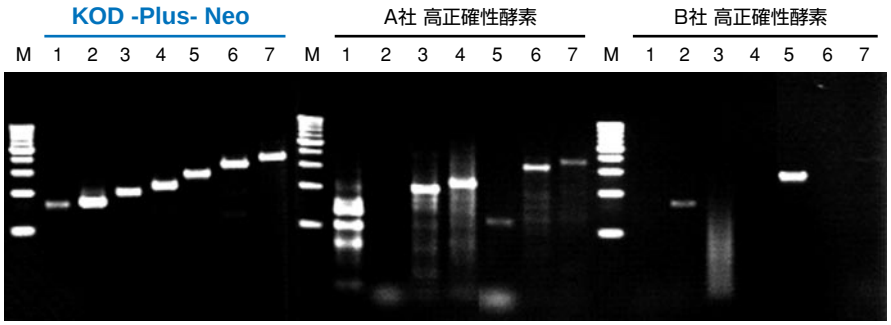
KOD -Plus- Neoによって増幅されたDNAの末端は他のKOD -Plus-シリーズPCR酵素同様に平滑化されていますので、末端を制限酵素処理するか、平滑末端クローニングの手法を用いてクローニングを行う必要があります。また、専用のTAクローニングキット「TArget Clone™ -Plus-（Code No. TAK-201）」を用いることで、増幅産物に直接Aを付加し、そのまま容易にTAクローニングを行うことができます。本キットのパーツである10×A-attachment Mixには、抗KOD DNA polymerase抗体とTaq DNA polymeraseが含有されており、PCR終了後の未精製のPCR産物に添加、反応させることにより末端にAを付加し、そのまま添付のTベクターに連結することができます。また、10×A-attachment Mixのみの別売品（Code No.TAK-301）をご使用いただくことで、任意のTベクターに産物をクローニングすることも可能です。



＊ TArget Clone™ -Plus-（Code No. TAK-201）に含まれています。
**Ligation high Ver.2（Code No. LGK-201）を推奨いたします。

実施例1　Total RNAからの様々な遺伝子の全長ORFの増幅

HeLa cell由来Total RNA 1μgから合成したcDNA約50ngを使用して、様々なプロテインキナーゼのORF（open reading frame）の全長を増幅しました。サイクルは各酵素の最適条件にて、30サイクル行いました。その結果、KOD -Plus- Neoで増幅した場合にのみ、すべての遺伝子で明瞭な増幅産物を得ることができ、すべてのORFを迅速にクローニングすることが可能でした。



〈伸長時間〉　30sec./ kb　1min./ kb　30sec./ kb

【KOD -Plus- Neoのサイクル条件】
94℃, 2min.
98℃, 10sec.
68℃, 30sec./kb
30 cycles

M: 1kb DNA Ladder
1: Human brk Tyrosine kinase（1.6kb）
2: Human rac protein kinase-alpha（1.7kb）
3: Human 63kDa protein kinase（2.0kb）
4: Human c-syn protooncogene（2.2kb）
5: Human FER Tyrosine kinase（2.7kb）
6: Human cell adhesion kinase beta（3.2kb）
7: Human Jak2 kinase（3.6kb）

図4．様々な遺伝子の全長ORFでの増幅効率比較

【プライマー】

1 F :ATGGTGTCCCGGGACCAGGCT
R :GACCTCTGCTGGCTTCGTGTCAC

2 F :TGTCAGCTGGTGCATCAGAG
R :GCGTGGCTTCTCTCAAATGCAC

3 F :ACTTGACAGAATGAGGTGCGCG
R :ATCCTTCACGTGTTCTGCCAAC

4 F :GTAGAGGCGAGGTTGTTGTGCG
R :CAGAGGAGGTTCGGATTTGGGG

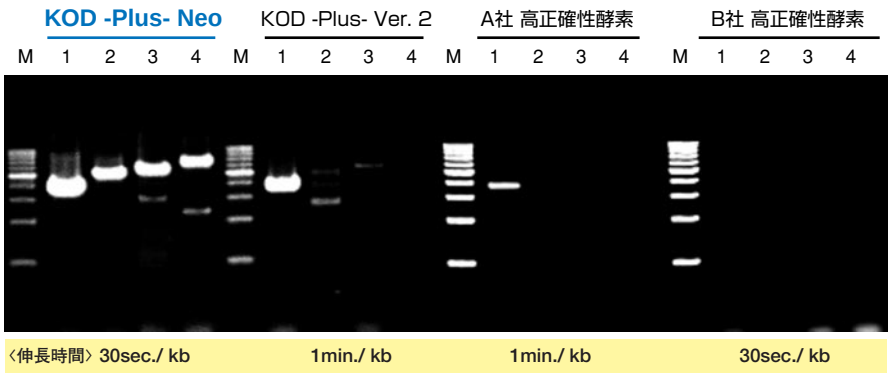
5 F :AGACTTCACTGCACGTTTTCTC
R :TGGAGGACAGAGTCCTGAAGGC

6 F :ACTGCAATGTGCCGATCTTAGC
R :TGCAAAGTGGCAAGGGAAGGT

7 F :GCCCGATCTGTGTAGCCGGTTT
R :ATCTTTGCTGGCTAGCATCATG

実施例2 微量Templateからの増幅

HeLa cell由来Total RNA 1μgから合成したcDNA 0.5 ngをサンプルとして、レア発現遺伝子として知られている4種類の遺伝子を増幅し、増幅効率を比較しました。増幅条件は各PCR試薬の最適条件を用い、40サイクルにて増幅を行いました。その結果、KOD -Plus- Neoのみ4種類の遺伝子すべてについて効果的な増幅を認めることができました。



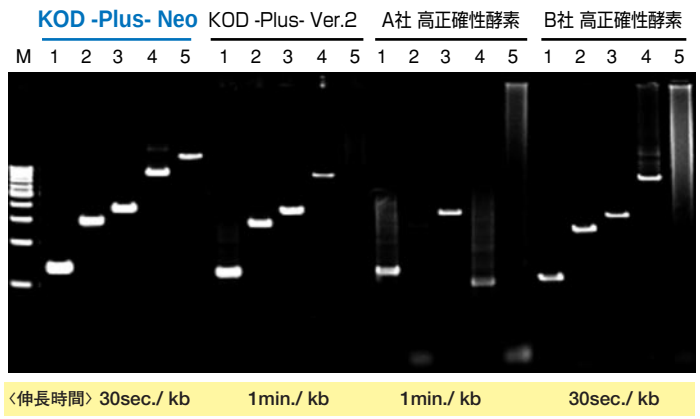
【KOD -Plus- Neoのサイクル条件】
94℃, 2min.
98℃, 10sec.
68℃, 30sec./kb
40 cycles

1: Human transferrin receptor (3.5kb)
2: Human Tuberous scleosis (5.3k)
3: Human adaptin (5.7kb)
4: Human polymerase ε (6.8 kb)
M: 1kb DNA Ladder

図5. 微量Templateからの増幅効率比較

実施例3 様々なサイズのターゲットにおける増幅効率・伸長性の比較

Human genomic DNA 50ngを用いて様々なサイズのβ-globin遺伝子の増幅を行いました。反応はそれぞれのPCR酵素の推奨条件に従って、30サイクルにて実施しました。その結果、KOD -Plus- Neoを用いた場合でのみ、17.5 kbまでの明瞭な増幅を確認することができました。また、17.5kb以下の増幅においても、他社PCR酵素を大幅に上回る収量が認められました。



【KOD -Plus- Neoのサイクル条件】

1～4:
94℃, 2min.
98℃, 10sec.
68℃, 30sec./kb
30 cycles

5:ステップダウンサイクル
94℃, 2min.
98℃, 10sec.
74℃, 30sec./kb
5 cycles
98℃, 10sec.
72℃, 30sec./kb
5 cycles
98℃, 10sec.
70℃, 30sec./kb
5 cycles
98℃, 10sec.
68℃, 30sec./kb
20 cycles
68℃, 7min.

1: Human β-globin 1.3kb
2: Human β-globin 2.7kb
3: Human β-globin 3.6kb
4: Human β-globin 8.5kb
5: Human β-globin 17.5kb
M: 1kb DNA Ladder

図6. 増幅効率・伸長性の比較

品名および内容	包　装*	保存温度	Code No.	価　格	キャンペーン価格
高正確・高効率・高速PCR酵素 **KOD -Plus- Neo** KOD -Plus- Neo (1U/μl) 10×Buffer for KOD -Plus- Neo 2mM dNTP 25mM $MgSO_4$	200U×1本[200回用]	-20℃	KOD-401	¥30,000	¥18,000
	(200U×1本)×5[1,000回用]	-20℃	KOD-401X5	¥120,000	対象外

*50μl反応を行ったときの反応回数で表示しています。

関連商品

品　名	包　装	保存温度	Code No.	価　格
高正確性PCR酵素 **KOD -Plus-**	200U×1本[200回用]	-20℃	KOD-201	¥30,000
高正確性PCR酵素(正確性をそのままにPCR成功率UP) **KOD -Plus- Ver.2**	200U×1本[200回用]	-20℃	KOD-211	¥32,000
高成功率PCR酵素 **KOD FX**	200U×1本[200回用]	-20℃	KFX-101	¥35,000
高効率TAクローニングキット(KOD用) **TArget Clone™ -Plus-**	10回用	-20℃	TAK-201	¥16,000
TAクローニング用A付加試薬(KOD専用) **10×A-attachment Mix**	25μl×1本[25回用]	-20℃	TAK-301	¥12,000
高効率ライゲーションキット **Ligation high Ver.2**	750μl×1本[100回用]	-20℃	LGK-201	¥22,000

TOYOBO

ホットスタート法対応・色素入りTaq Master Mix

Quick Taq® HS DyeMix

大幅価格改定!

日々の実験の強い味方!大幅価格改定により、更にお手軽にお使いいただけます。

Quick Taq® HS DyeMixは、日常のルーチンで行うPCRをより簡便にすることを目的として開発されたTaqマスターミックスです。以下のような特長があります。この度、大包装品を大幅価格改定により、更にお手軽にお使いいただけるようになりました。

特長1 プレミックス

・2×マスターミックスであり、プライマーを加えるだけでご使用いただけます。

特長2 ホットスタートPCR対応

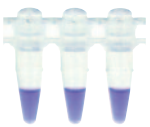
・抗Taq DNA polymerase抗体によるホットスタート法を採用しており、高い感度と特異性を示します。

特長3 色素入り

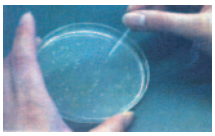
・色素(BPB: bromophenol blue)があらかじめ添加してあるため、PCR後にそのままゲルにアプライ可能です。

・Quick Taq® HS DyeMix*
・Primers
・PCR-grade water

*Quick Taq® HS Dye Mixは2×濃度に調製されています。
*凍結融解30回、4℃保存3ヶ月において安定性を確認しています。



サンプル添加
(DNA溶液、大腸菌コロニーなど)

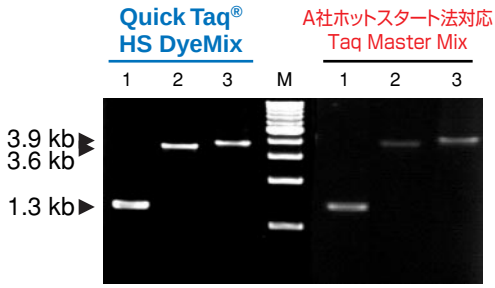


PCR
(ホットスタート法)

そのまま電気泳動

実施例 様々な条件における増幅効率の比較

ヒトゲノムDNA(50ng)、及び大腸菌コロニーを鋳型として、ヒトβ-globin遺伝子(1.3kb, 3.6kb)、及びプラスミドインサート(3.9kb)の増幅を実施しました。その結果、Quick Taq® HS DyeMixを用いた場合、高効率、かつ特異性の高い結果が得られました。



M: 1kb Ladder
1: β-globin(1.3kb)
2: β-globin(3.6kb)
3: コロニーダイレクトPCR(3.9kb)

《プライマー》
(β-globin 1.3kb)
Forward Primer : TTAGGCCTTAGCGGGCTTAGAC
Reverse Primer : CCAGGATTTTTGATGGGACACG
(β-globin 3.6kb)
Forward Primer : GGTGTTCCCTTGATGTAGCACA
Reverse Primer : ACATGTATTTGCATGGAAAACAACTC
(コロニーダイレクトPCR 3.9kb:P7, P8プライマー使用)
Forward Primer : CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC
Reverse Primer : AGCGGATAACAATTTCACACAGGAAAC
※終濃度0.2μMで使用

品　名	包　装	保存温度	Code No.	価　格
ホットスタート法対応・色素入りTaq Master Mix **Quick Taq® HS DyeMix**	(1.25ml×2本)×10[1,000回用*]	-20℃	DTM-101X10	¥70,000(改定前) **¥44,000**(改定後)
	1.25ml×2本[100回用*]	-20℃	DTM-101	¥9,800

*50μlで反応した場合の反応回数を記載しています。

高効率リアルタイムPCR用マスターミックス

THUNDERBIRD™ qPCR Mix
サンダーバード

特異性、ダイナミックレンジ、コストパフォーマンスに優れたリアルタイムPCR試薬です。

THUNDERBIRD™ qPCR Mixは、Taq DNA polymeraseをベースとして開発された、高効率リアルタイムPCR用マスターミックス（2×濃度）です。本製品は、新規エンハンサーの採用を含め、組成を根本的に見直すことによって、反応特異性とPCR効率が飛躍的に向上しています。これらの改良によって、幅広い定量可能域（ダイナミックレンジ）を実現しました。また、実験のランニングコストを大幅におさえることが可能になりました。

特長1 高い特異性（プライマーダイマーの低減）

・組成の最適化により、PCRの特異性が向上。非特異反応の低減によって、SYBR® Green Ⅰ、及びTaqMan®アッセイにおいて、低コピー数のターゲットの検出感度が向上しました。

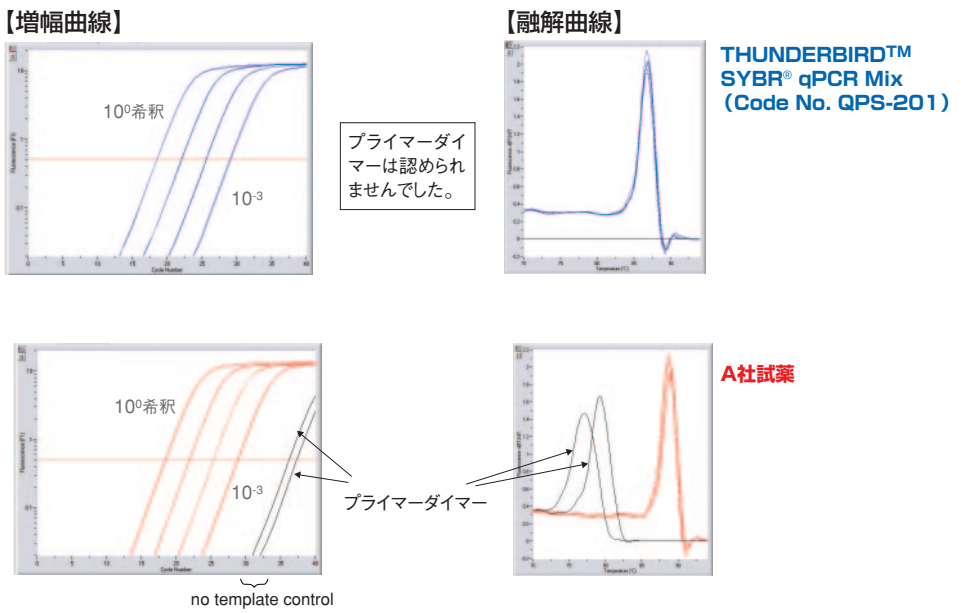


図1．SYBR® Green Ⅰ検出系による反応特異性の比較（Roche Diagnostics LightCycler® 1.1使用）

プライマーダイマーが発生しやすいプライマーセットを用いて、各リアルタイムPCR試薬による反応特異性の比較を行いました。
プライマーセットは、ヒトβ-Actin cDNAに対するもの、鋳型には弊社の高性能逆転写反応用試薬「ReverTra Ace® qPCR RT Kit（Code No. FSQ-101）」により合成したHeLa細胞Total RNA由来cDNAを用い、cDNAの10倍段階希釈液(4段階)と、no-template control（NTC）について、それぞれduplicateにて反応を実施しました。

特長2 様々なターゲットを均一に検出

・ターゲットごとのPCR効率のばらつきを最小限に抑える効果のある新規エンハンサーを採用。*

＊特許出願中

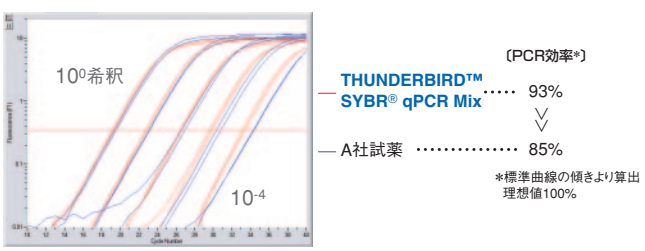


図2．SYBR® Green Ⅰ検出系によるノロウイルスGI cDNAの検出
（縮合プライマー使用）（Roche Diagnostics LightCycler® 1.1使用）

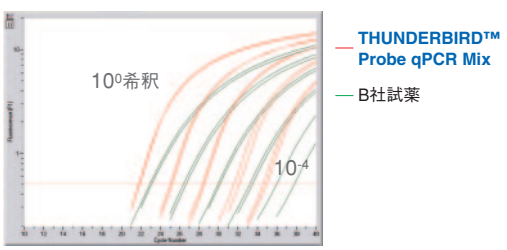


図3．TaqMan® 検出系によるGAPDH cDNAの定量
（Roche Diagnostics LightCycler® 1.1使用）

特長3 広いレンジで検出可能

・特異的（特長1）、かつ高効率（特長2）な増幅により、広い測定レンジでの解析が可能になりました。

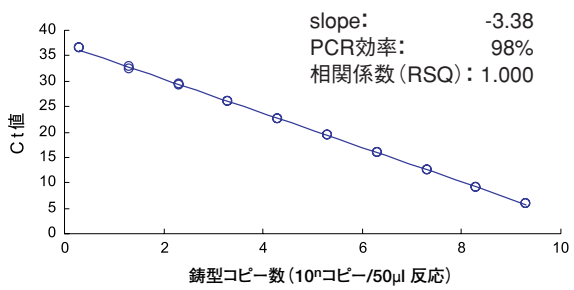


図4. SYBR® Green I 検出によるプラスミド10倍希釈系列の検出
（Applied Biosystems 7900HT使用）

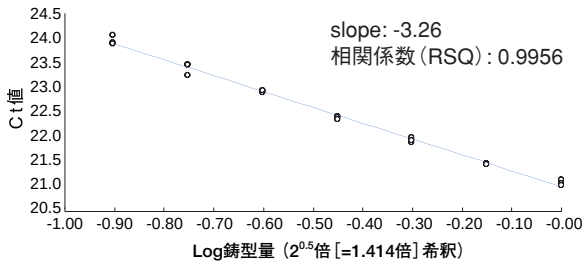


図5. SYBR® Green I 検出によるcDNA $2^{0.5}$倍希釈系列の検出
（Applied Biosystems 7900HT使用）

特長4 様々な機器に対応

・一般的なブロックタイプの機器（Fast Modeにも対応）のほか、ガラスキャピラリーを用いる高速サイクラーにも対応しています。
また、50× ROX reference dyeが別添付されているため、パッシブリファレンスを使用する機器（Applied Biosystems社製機器、Stratagene社製機器など）においても、各機種の特性に応じた最適なROX濃度でご使用いただけます。

Applied Biosystems	ABI PRISM 7000	●
	ABI PRISM 7700	●
	Applied Biosystems 7300	●
	Applied Biosystems 7500	●
	Applied Biosystems 7500 Fast	●
	Applied Biosystems 7900HT	●
	Applied Biosystems Step One™	○
	Applied Biosystems Step One Plus™	○
Roche Diagnostics	LightCycler 1.x	●
	LightCycler 2.0	●
	LightCycler 480	○

Bio-Rad/MJ	iCycler iQ	●
Stratagene	Mx3000P	●
	Mx3005P	●
	Mx4000	○
TaKaRa	Thermal Cycler Dice	●
BioFlux	Line Gene	●

● 使用実績あり
○ 使用可能（実績なし）*

*試薬サンプルを準備しております。お問い合わせください。

特長5 高速ホットスタート

・抗Taqポリメラーゼ抗体を用いるホットスタートシステムを採用しています。抗体は加温により速やかに失活するため、最初の変性時間を短時間に設定できます。

特長6 高いコストパフォーマンス

・実験のランニングコストを大幅におさえることが可能になりました。

品名および内容	包　装	保存温度	Code No.	価　格
TaqMan®アッセイ用 **THUNDERBIRD™ Probe qPCR Mix** ・THUNDERBIRD™ Probe qPCR Mix ・50× ROX reference dye	1ml×1本〔40回用〕	-20℃	QPS-101T	¥8,500
	1.67ml×3本〔200回用〕	-20℃	QPS-101	¥29,000
	（1.67ml×3本）×5〔1000回用〕	-20℃	QPS-101X5	¥133,000
SYBR® Green I アッセイ用 **THUNDERBIRD™ SYBR® qPCR Mix** ・THUNDERBIRD™ SYBR® qPCR Mix ・50× ROX reference dye	1ml×1本〔40回用〕	-20℃	QPS-201T	¥8,500
	1.67ml×3本〔200回用〕	-20℃	QPS-201	¥29,000
	（1.67ml×3本）×5〔1000回用〕	-20℃	QPS-201X5	¥133,000

※50× ROX reference dyeがマスターミックスとは別容器で供給されます。※包装の欄に記載の反応回数は、50μl反応時のものです。容量はqPCR Mixのみ示しています。
※大包装品（QPS-101X5およびQPS-201X5）は、QPS-101もしくはQPS-201の5セット組です。
※TaqMan®は、Roche Molecular Systems Inc.の登録商標です。　※SYBR®は、Molecular Probes Inc.の登録商標です。

関連商品 **高効率リアルタイムPCR用cDNA合成キット「ReverTra Ace® qPCR RT Kit」（Code No.FSQ-101）とのお得なセット販売を行っております。**

品　名	内　容	保存温度	Code No.	価　格
THUNDERBIRD™ Probe qPCR/RT Set	**THUNDERBIRD™ Probe qPCR Mix**（200回用）と **ReverTra Ace® qPCR RT Kit**（200回用）とのセット	-20℃	QPS101/FSQ101	¥63,000
THUNDERBIRD™ SYBR® qPCR/RT Set	**THUNDERBIRD™ SYBR® qPCR Mix**（200回用）と **ReverTra Ace® qPCR RT Kit**（200回用）とのセット	-20℃	QPS201/FSQ101	¥63,000

※本品は、THUNDERBIRD™ qPCR Mix（¥29,000→¥27,300）とReverTra Ace® qPCR RT Kit（¥38,000→¥35,700）のセット販売品です。

製品 KOD FX を用いた実施例

ホルマリン固定パラフィン包埋切片から抽出したDNAの解析

データご提供　福岡大学 医学部 病理学講座　石黒晶子先生、竹下盛重先生、福重智子先生

ホルマリン固定を行った組織から抽出したDNAは切断、化学修飾等の影響を受けているため、PCR効率が極度に低下することが知られています。今回、このようなDNAサンプルを用いて、高効率に増幅する方法をご紹介します。

実験方法

サンプル　ホルマリン固定パラフィン包埋材料（ヒト）
（今回使用した切片の厚さは約10μmで、大きさは1cm×2cm程度）

前処理　5～10μmパラフィン包埋切片を1.5mlチューブに移す
↓
脱パラフィン
キシレンを入れ5分放置後遠心してキシレンを除去
（3回繰り返す）
↓
脱キシレン
100%エタノールを入れ5分放置してエタノールを除去
（4回繰り返す）
↓
エタノールを除いた後、70℃・5分でエタノールを完全に除去
↓
10mM Tris-HCl（pH 8.0）300μl※1を加えた後※2、Proteinase K（10mg/ml）を10μl加え、37℃で一晩放置※3, 4
↓
加熱処理（70℃、10 min）⇒ そのままPCR用サンプルとして使用②
↓
カラム精製（シリカメンブレンを用いたスピンカラムタイプを使用）
⇒ DNA鋳型として使用①

ターゲット　Human β-globin　268bp

プライマー*　Primer F: GAAGAGCCAAGGGCAGGTAC
Primer R: CAACTTCATCCACGTTCACC

＊**参考文献：***Am.J.Pathol.* **154**；67-75,1999

※1　本実験では、10mM Tris-HCl（pH 8.0）を300μl添加していますが、サンプル量に応じて50～300μlを使用します。Proteinase Kはその量に応じて、増減させてください。

※2　切片が大きいときは、bufferを加えた後、眼科用のはさみで1mm以下になるぐらいまで細かく切ってからProteinase Kを添加します。

※3　37℃で一晩おいて未消化の組織が多いときは、さらに5～10μl　Proteinase Kを加えて2～3時間消化します。

※4　組織の細胞密度や種類によって消化の具合はかなり変化します。線維組織はProteinase K で消化されないので、筋肉や膜などが多い組織は完全には溶解しません。

反応溶液

滅菌蒸留水	3.6（μl）
2×PCR buffer for KOD FX	10
2mM dNTPs	4
10pmol / μl Primer F	0.5
10pmol / μl Primer R	0.5
KOD FX （1.0U /μl）	0.4
精製DNA or ライセート	1*
Total	20

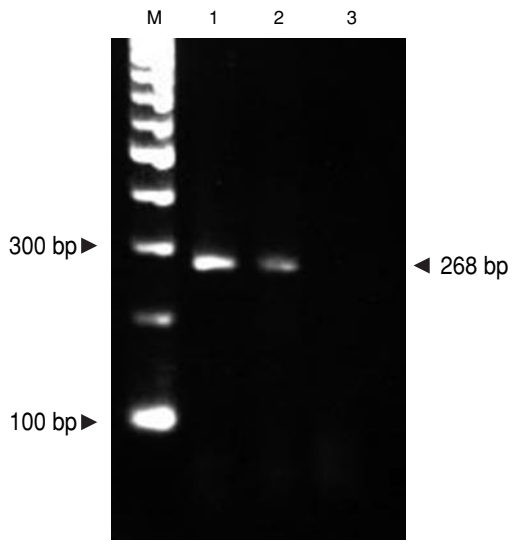
PCRサイクル

94℃ 15 min**
↓
98℃ 10 sec
57℃ 30sec
68℃ 30sec
38 cycles

＊ Proteinase K処理後のライセートは1μlを目安に添加します。
精製DNAの添加量は、20μl反応系で約100ngを目安にします。組織の量が少なかった場合は回収量が少なくなりますので、カラムから最少量でDNAを溶出し、適量を添加します。添加量が1μlを超える場合は、滅菌蒸留水の量を調整します。

＊＊ ホルマリン固定組織から得られたDNAの増幅では、最初の変性ステップを7〜15分程度に設定することで良好な結果を得ることができるようです。

結　果



M: 100bp DNA Ladder
1: Proteinase K処理後、カラム精製したDNA①
2: Proteinase K処理後、70℃10分処理したクルードサンプル②
3: DW
〈アプライ量：2μl / Lane〉

先生からのコメント

他社のポリメラーゼを用いた場合、精製DNAを用いても増幅できない検体が多かった。一方、KOD FXを用いることで精製DNA及び、Proteinase K処理後のパラフィン包埋材料のライセートから高効率にPCR産物を得ることができた。小さな組織の場合、精製するとDNAがより少なくなるので、精製しないでPCRに使えるのが良い。

高成功率PCR酵素 **KOD FX**

包　装	Code No.	価格
200U ×1本	KFX-101	¥35,000
(200U ×1本) ×5	KFX-101X5	¥140,000
(200U ×1本) ×10	KFX-101X10	¥260,000

KOD FXは、マウステールライセート、植物ライセート、血液など様々なクルードサンプルから直接、高効率なPCRを行うことができます。
実施例は弊社ウェブサイト（http://www.toyobo.co.jp/bio）KOD FXコーナーで公開しております。是非一度ご覧ください。

高成功率PCR酵素『KOD FX』を用いた糸状菌からのコロニーPCR

東洋紡績（株）　敦賀バイオ研究所　歌島 悠

はじめに

『KOD FX』は、様々な優れた特性を有するPCR酵素『KOD DNA Polymerase』をベースに開発された高性能PCR試薬です。本酵素は、優れた「増幅成功率」を示し、血液や培養細胞、マウステールや植物サンプル（葉、米粒）から直接、もしくは、簡便な前処理にて調製したライセートをPCR反応液に添加するだけで、確実に増幅産物が得られることを確認しております。つまり、従来、サンプルからDNAを一旦精製してから行っていたようなPCR実験も、『KOD FX』を用いることによって、DNAの精製が不要になったり、簡単な前処理のみでPCR増幅が可能になります。

今回は、クルードかつ微量サンプルからの実施例として糸状菌コロニーからの簡便なPCR増幅を試みました。糸状菌は国内では“国菌”と称される*Aspergillus oryzae*のゲノム解析が2005年に完了、報告されたことを始め、高いタンパク質生産能力と安全性から、有用タンパク質の生産宿主としても期待されています。しかし、糸状菌からのコロニーPCRは、研究者の間では非常に困難であることが知られており、遺伝子のクローニング、遺伝子挿入位置の確認、などを行う場合には高純度のゲノムDNAを精製する必要がありました。そこで今回は、糸状菌のコロニーから菌体を回収し、『KOD FX』と簡便な前処理と組み合わせることによって、糸状菌コロニーから直接PCR増幅を行うことを試みました。以下、その方法及び結果をご紹介いたします。

方　法

（1）前処理（熱処理）

糸状菌（*Aspergillus oryzae*）を生育させたプレートから、爪楊枝で菌体を回収し、TE buffer 50μl に懸濁します。懸濁液をサーマルサイクラーで95℃, 10min熱処理を行った後、上清5μlをサンプルとしました。

（大過剰に菌体を回収すると増幅率が悪くなることがあります。回収する菌体量は少量で十分です。）

（2）PCR反応

PCR反応は、（1）で調製したサンプル5μlを直接PCR反応液に添加し、以下の条件にて実施しました。

①反応液組成

PCR grade water	6	μl
2x PCR buffer for KOD FX	25	μl
2mM dNTPs	10	μl
10pmol /μl Primer #1	1.5	μl
10pmol /μl Primer #2	1.5	μl
前処理サンプル	5	μl
KOD FX（1.0U/μl）	1	μl
Total reaction volume	50	μl

Target: ITS-1 150bp～470bp
Primer #1: GTAACAAGGT（T/C）TCCGT
Primer #2: CGTTCTTCATCGATG

②PCRサイクル

94℃, 2min.
↓
94℃, 30sec.
55℃, 1min
68℃, 1min
（30 cycles）

図1. *Aspergillus oryzae*のジャイアントコロニー

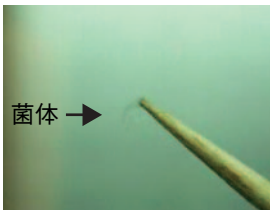


図2. 回収した*Aspergillus oryzae*の菌体

プレートに生育したコロニーから菌体を回収
（上図ご参照）
↓
50μlのTE bufferに懸濁し、95℃ 10min インキュベート
↓
卓上遠心機で遠心し、上清5 μlをPCR反応に使用

また、比較のためTaqベースの他社PCR酵素を用いて、取扱説明書推奨の条件にてPCRを実施し（サイクルは同じく30サイクル）、比較を行いました。

さらに、*Aspergillus oryzae*だけでなく、各種糸状菌、酵母に関しても同様の処理を行い、PCRを実施しました。

結果および考察

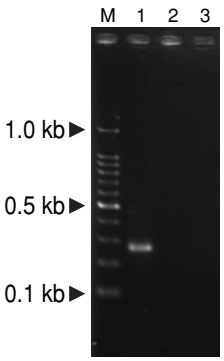


図3. *A.oryzae*コロニーからのPCR

M：100bp ladder
1：KOD FX
2：A社 高効率PCR酵素
3：B社 Long PCR酵素

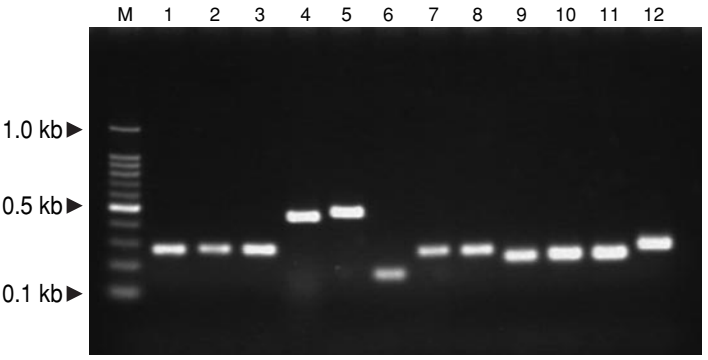


図4. 各種糸状菌・酵母コロニーからのPCR

M：100bp ladder
1：*Aspergillus oryzae*
2：*Aspergillus niger*
3：*Aspergillus terreus*
4：*Saccharomyces cerevisiae*
5：*Schizosaccharomyces pombe*
6：*Pichia pastris*
7：*Penicillium camemberti*
8：*Penicillium requeforti*
9：*Magnaporthe salvini*
10：*Schizophyllum commune*
11：*Sagenomella oligospora*
12：*Thysanophora penicillioides*

PCR産物は、2%アガロースゲルに5μlアプライして解析を行いました（図3）。その結果、KOD FXを用いた場合のみ、明瞭な増幅が確認できました。また、各種糸状菌、酵母を用いた場合でも、今回用いた12菌株全てで明瞭な増幅が確認できました（図4）。

糸状菌は核に加えて強固な細胞壁を持っており、ゲノムDNAを十分に溶出させるためには、凍結粉砕、界面活性剤による溶解などの操作を行う必要があります。しかしKOD FXを用いることにより、熱処理によって溶出した微量なDNAを鋳型としてPCRによる増幅が可能でした。これは、従来のTaqベースのPCR酵素と比較して、KOD FXがクルードサンプルに強いことに加え、増幅効率の点においても圧倒的に優れていることによるものと考えられました。

まとめ

糸状菌からのゲノムDNAの精製は、菌体の凍結粉砕、SDSによるDNAの溶出、フェノール、クロロホルム抽出による夾雑タンパク質の除去、RNase処理、アルコール沈殿による精製と多段階にわたるため、多数の検体を処理するには莫大な労力が必要となります。

一方、KOD FXを用いたコロニーPCRを行うことにより、ゲノムDNAの精製工程を省略することができ、生育した菌体から簡便・迅速にPCRを行うことができるようになります。糸状菌・酵母などの真菌類からのDNA実験をされる場合は、是非、一度お試しください。

マウステール、植物、微生物サンプルの実施例はこちら！ 1 弊社ウェブページ www.toyobo.co.jp/bio 2 KOD FXコーナー

品名および内容	包　装	保存温度	Code No.	価　格
KOD FX KOD FX（1U/μl） 2×PCR Buffer for KOD FX 2mM dNTPs	200U×1本［200回用*］	-20℃	KFX-101	￥35,000
	（200U×1本）×　5［1,000回用*］	-20℃	KFX-101X5	￥140,000
	（200U×1本）×10［2,000回用*］	-20℃	KFX-101X10	￥260,000
2×PCR Buffer for KOD FX	1.7ml×3本	-20℃	KFX-1B	￥5,000

＊50 μl反応を行った時の反応回数を表示しています。
※KOD FXで増幅されたDNA断片は平滑化されているため、通常のTAクローニングはできません。TArget Clone™ -Plus-をお使いください。

関連商品

品　名	包　装	保存温度	Code No.	価　格
KOD用高効率TAクローニングキット **TArget Clone™ -Plus-**	10回用	-20℃	TAK-201	￥16,000

CELL APPLICATIONS, INC.

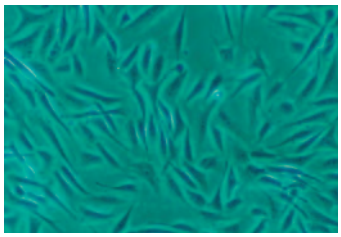
Cell Applications, INC. 製品

国内販売開始10周年記念

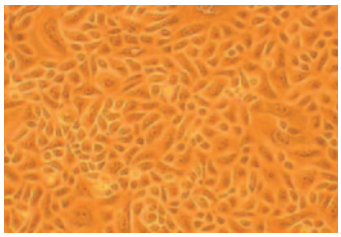
各種初代細胞をはじめTotal RNA、抗体などを取り揃えております。

Cell Applications, INC.（CAI社）では、ヒト及び動物に由来する初代細胞、培地、Total RNA、抗体などの製品を販売しております。

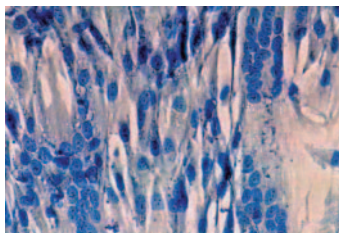
日本でのCAI社製品販売開始10年を記念して、下記のディスカウント価格を常時適用してご提供させていただきます。CAI社の全製品を対象とし、組み合わせは自由です。是非、実験にお役立てください。



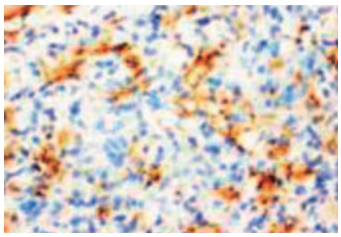
ヒト頭髪毛乳頭細胞
（Code No.CA60205a）



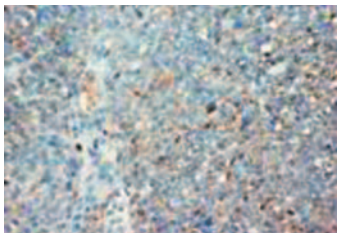
ヒト表皮角化細胞
（Code No.CA10205a）



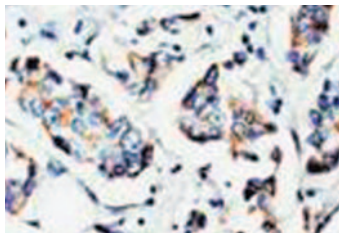
ヒト骨格筋細胞
（Code No.CA15005f）



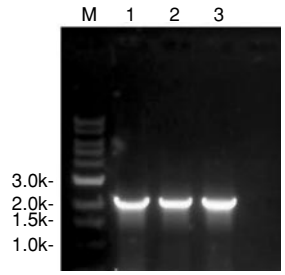
ラット脾臓組織 CD54抗体
（Code No.CACA0541）



ヒト卵巣癌組織 Caspase-8抗体
（Code No.CACA0689）



ヒト乳癌組織 VEGF-D抗体
（Code No.CACA1461）



Hsp60 primer 1によるRT-PCR

Total RNA 1. Testis（Code No.CA1H51-50）
2. Stomach（Code No.CA1H20-50）
3. Pancreas（Code No.CA1H23-50）

一回のご注文で…

- ●5～9点ご購入の場合 ➡ 10%OFF
- ●10～19点ご購入の場合 ➡ 15%OFF
- ●20～29点ご購入の場合 ➡ 20%OFF
- ●30～39点ご購入の場合 ➡ 25%OFF
- ●40点以上ご購入の場合 ➡ 30%OFF

CAI社の製品であれば、色々な製品を組み合わせていただいて、結構です!!

※この価格でのご提供は、予告なく終了させていただく場合がございます。

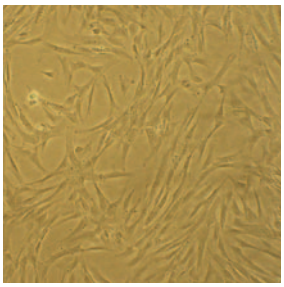
●CAI 社製品は、弊社ウェブサイト（www.toyobo.co.jp/bio）の下記のコーナーでご確認いただけます。

弊社ウェブページ
（www.toyobo.co.jp/bio）

- 初代細胞 → 細胞・創薬支援関連製品 → 正常細胞
- Total RNA → 新着製品情報 → クローニング・遺伝子解析 → Total RNA (Tissue & Cell)
- 抗　体 → オンラインカタログ → 商品検索

CELL APPLICATIONS, INC.

ヒト / ラット アストロサイト



アストロサイト（星状細胞）は中枢神経系に多く存在する細胞で、ニューロンの支持や養分の供給、不要物の除去といった機能を持っています。また、血液脳関門を形成する内皮細胞を生化学的にサポートする役割も担っています。最近の研究から、アストロサイトが神経形成の調節を行う可能性があることが示されました。

アストロサイトの機能探求のため、アストロサイト初代細胞をお役立てください。

ヒトアストロサイト

品名および内容	包装	Code No.	価　格
ヒトアストロサイト Total Kit（fetal） ・凍結細胞 ・ヒトアストロサイト増殖培地 ・サブカルチャー試薬セット（A）	1Kit	CA882K05f	¥145,000
ヒトアストロサイト凍結細胞（fetal） （5×10^{5}cells）	1vial	CA88205f	¥110,000
ヒトアストロサイト増殖培地	500ml	CA821500	¥25,000
サブカルチャー試薬セット（A）	1set	CA090K	¥15,000

ラットアストロサイト

品名および内容	包装	Code No.	価　格
ラットアストロサイト Total Kit（adult） ・凍結細胞 ・ラットアストロサイト増殖培地 ・サブカルチャー試薬セット（A）	1Kit	CAR882K05a	¥109,000
ラットアストロサイト凍結細胞（adult） （5×10^{5}cells）	1vial	CAR88205a	¥74,000
ラットアストロサイト増殖培地	500ml	CAR821500	¥25,000
サブカルチャー試薬セット（A）	1set	CA090K	¥15,000

※保存温度は、細胞:液体窒素、培地・サブカルチャー試薬セット（A）:-20℃です。

SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY

Transfected Lysate

Santa Cruz Biotechnologyでは、5,000以上のタンパク質を過剰発現させた細胞ライセートをご用意しています。SDS-PAGE bufferに溶解されていますので、使用前に加熱するだけで、ゲルにアプライできます。

ウェスタンブロット解析のポジティブコントロールとして是非ご利用ください。

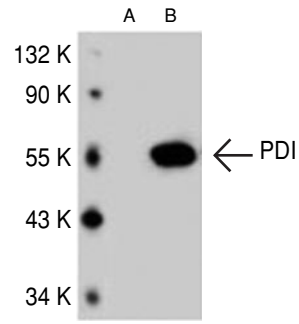


図1．PDI（H-17）（Code No.SASC30932）抗体による
ウェスタンブロット解析
A：293T Control Lysate（Code No.SASC117752）
B：PDI transfected 293T Lysate（Code No.SASC111237）

＜輸送・保存温度：-20℃＞

品　名	包装	Code No.	価格
Transfected Lysate各種	100μg/200μl	各種	¥39,000
293 Control Lysate （non transfected）	100μg/200μl	SASC 110760	¥20,000
CHO Control Lysate （non transfected）	100μg/200μl	SASC 117750	¥20,000
293T Control Lysate （non transfected）	100μg/200μl	SASC 117752	¥20,000

※詳しくは、こちらのサイトをご覧ください。
http://www.scbt.com/transfected_lysates.html

●学会出展のご案内

下記の学会にて、新製品やキャンペーンなどのご紹介を行います。ブースには製品に詳しいスタッフがおりますので、ご質問などがございましたら、その場でお気軽にご質問ください。また、楽しいイベントも企画しています。学会にお越しの際は是非、弊社ブースにお立ち寄りください。

第22回　日本動物実験代替法学会総会・学術大会
期間：2009年11月13日（金）～11月15日（日）
会場：大阪大学吹田キャンパス銀杏会館

第32回　日本分子生物学会年会
期間：2009年12月9日（水）～12月12日（土）
会場：パシフィコ横浜（横浜みなとみらい）

●大包装品発売および価格改定のご案内

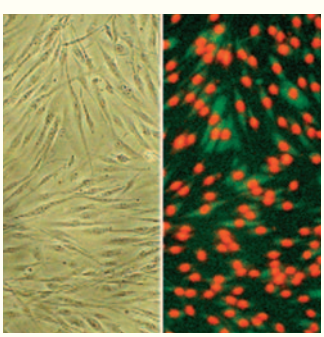
ご好評いただいております高性能Taq DNA polymerase『Blend Taq®シリーズ』が以下の大包装品の発売および価格改定により、さらにお求め安くなりました。一層のご愛顧を宜しくお願いいたします。

＜保存温度：-20℃＞

品名および内容	包　装	Code No.	旧価格	新価格
高性能Taq DNA polymerase **Blend Taq®** Blend Taq®（2.5U/μl） 10×Buffer 2mM dNTPs	250U×1本［200回用］	BTQ-101	¥19,000	変更なし
	(250U×1本) × 5［1,000回用］	BTQ-101X5	¥82,000	¥76,000
	(250U×1本) × 10［2,000回用］	BTQ-101X10	-	¥133,000 NEW
高性能Taq DNA polymerase（ホットスタート対応） **Blend Taq® -Plus-** Blend Taq® -Plus-（2.5U/μl） 10×Buffer 2mM dNTPs	250U×1本［200回用］	BTQ-201	¥21,000	変更なし
	(250U×1本) × 5［1,000回用］	BTQ-201X5	¥90,000	¥84,000

●初代細胞ロット情報配信のご案内

東洋紡ではCell Applications, Inc.（CAI）取扱い細胞のロット情報（年齢・性別・人種など）およびその在庫状況を毎月1～2回、メールアドレスを登録されたお客様にE-mailでお送りしております。特定の部位、性別、人種由来の細胞で実験をされたい場合、このリストの細胞を、Lot 指定でご注文いただくことが可能です。ご希望の方は、こちらのサイトにてご登録ください。



1 弊社ウェブページ（www.toyobo.co.jp/bio）
2 お問い合わせ・ご請求
3 資料請求・情報配信依頼
4 CAI正常細胞ロット情報配信依頼

https://secure.toyobo.co.jp/bio01/html/cai/cai_form.html

みんなの広場

❊実験川柳特集 10

本コーナーは、弊社ウェブサイト（www.toyobo.co.jp/bio）「読者のコーナー」で最新の作品を確認いただけます。

なにもかも　疑いたくなる　長期不振
匿名希望　とむ さん

【句評】私も、使っていたバッファーを全部作り変えたことあります。最後には、サーマルサイクラーのスタートボタンを押すときにお祈りしたりしました。

うたた寝や　ガスバーナーで　髪焦がし…
匿名希望　切ない補助員 さん

【句評】髪は女の命。大切にしてくださいね。というか、焼死しないように！ そういえば、カラム溶出していた後輩が、眠ってしまって、フラクションを白衣で受けていたのを見たことがあります。

縁組みの　達人を生む　遺伝学
匿名希望　るるる さん

【句評】少子化の折、この縁組の理論が人間の縁組にも実用化される日を切に願っております。

アガロース　バンド無いとこ　再利用
匿名希望　kssx さん

【句評】逆流させてゲルをクリアする技もありますよ。電気がもったいないですけどね。

使うのが　制限される　酵素かな
匿名希望　ぽんぽん さん

【句評】"制限"という言葉がこのように使われるとは、制限酵素の提唱者は想像もしなかったでしょうね。

●ぽんぽんさんのコメント制限酵素、高いのでケチらされるんですよ…

⇒弊社ウェブサイト（読者のコーナー＞ご投稿コーナー）からご投句いただけます。

ご投句はこちらから　1 弊社ウェブページ（www.toyobo.co.jp/bio）　2 読者のコーナー　3 ご投句コーナー

http://www.toyobo.co.jp/seihin/xr/lifescience/tech/reader/contribute/index.html

採用になった方には、￥2,000の図書カードと認定証をご進呈いたします（詳しくはサイトをご覧ください）。奮って投句ください。

ISO 9001 登録

東洋紡績株式会社の敦賀バイオ工場／敦賀バイオ研究所はLloyd,s Register Quality Assurance(LRQA)により日本はもとよりイギリス、アメリカ、オランダ、ドイツ、オーストラリアにおいてもISO 9001の認証登録されております。
本誌掲載の商品の内、本工場で製造されております制限酵素(Restriction Endonucleases)ならびに修飾酵素(Modifying Enzymes)は、品質マネジメント・システム沿って管理・運営・維持されております。

ISO 14001 登録

東洋紡績株式会社のつるが工場は環境マネジメントシステムに係る日本の認定機関である(財)日本適合性認定協会(JAB)に審査機関の認定を受けた日本検査キューエイ協会(JIC Quality Assurance Ltd.)によりISO14001の認証登録されております。東洋紡績株式会社敦賀バイオ事業所はつるが工場の環境マネジメントシステムの適用を受け活動を推進しており、敦賀バイオ事業所の製造するバイオ関連商品はISO14001の認証を受けた工場／研究所で開発、製造されています。

NOTICE TO PURCHASER : LIMITED LICENSE

●PCR関連商品のラベルライセンスについての詳細は、弊社ウェブサイト（www.toyobo.co.jp/bio）をご覧ください。

●本ページ掲載の試薬類は全て一般研究用の目的にのみ販売しており、医薬品、診断用医薬品、化粧品、食品用等には使用できませんので、十分ご注意ください。誤用による事故については、当社は一切の責任を負いません。
●本ページ掲載商品には消費税は含まれておりません。実際のご購入価格については弊社代理店へお問い合わせください。
●本ページ中の略号: 毒 印は毒物および劇物取締法に基づく医薬用外毒物です。劇 印は毒物および劇物取締法に基づく医薬用外劇物です。危 印は消防法に基づく危険物です。